Beiträge zur Kenntnis der alkohollöslichen heterophilen Hammelblutantigene.

Von

Hans Schmidt.

(Aus dem Institut für pathologische Biologie, Hamburg. [Prof. H. Much.])

(Eingegangen am 25. I. 1921.)

Inhaltsübersicht.

	Seite
Einleitung	433
I. Verhalten sich die Organe des Meerschweinchens verschieden in bezug auf die Ausflockung ihrer alkoholischen Auszüge durch Hammelblutkaninchenimmunserum?	436
II. Geben alkoholische Auszüge aus Organen anderer Tiere mit Kaninchen-Schafbluthämolsin eine Ausflockung?	438
III. Gibt auch das normale Serum von Kaninchen, anderen Tieren oder Menschen Ausflockungen mit alkoholischen Organextrakten der verschiedenen Tiere?	440
IV. Geben Hammelblutantisera anderer Tiere Flockung mit alkoholischen Organextrakten?	443
V. Sind getrocknete Organe den frischen vorzuziehen, und läßt sich das heterophile Antigen auch mit anderen Mitteln extrahieren?	443
VI. Läßt sich das heterophile Antigen aus Organen in NaCl-Lösung und durch Präzipitation mit Kaninchen-Schafbluthämolsin nachweisen?	445
VII. Zur Frage der Spezifität der Ausflockung; Abhängigkeit der Flockung von Hämolsingehalt des Immunserums	447
VIII. Physikalisch-chemisches über die Ausflockung	455
A. Einfluß der Verdünnung	455
B. Einfluß der Konzentration	455
C. Einfluß der Temperatur	456
D. Einfluß der Salzkonzentration	457
E. Einfluß der Oberflächenspannung	458
IX. Über Immunisierungsversuche mit Extrakten	460
Zusammenfassung	461

Einleitung.

Seit der Entdeckung Forßmans ¹⁾, daß es auch durch Einspritzung von Meerschweinchenorganzellen gelingt bei Kaninchen hochwertige und spezifische Hämolsine für Schafblutkörperchen zu erzeugen, ist auf diesem Gebiete

¹⁾ Biochem. Zeitschr. 1911. 37, 78; 1912. 44, 336.

von einer Reihe von Autoren wie Orudschiew¹⁾, Bail und Margulis²⁾, Doerr und Pick³⁾, Weil⁴⁾, Sachs und Nathan⁵⁾, Friedberger und Schiff⁶⁾, Schiff⁷⁾, Amako⁸⁾, Forßman und Fex⁹⁾, Morgenroth und Bieling¹⁰⁾, Spät¹¹⁾, Sachs und Georgi¹²⁾, Tsuneoka¹³⁾, Friedemann¹⁴⁾ usw., so gründlich weiter gearbeitet worden, daß wir Folgendes als gesichertes Forschungsergebnis betrachten können:

Die Einspritzung von roten Hammelblutzellen löst beim Kaninchen die Bildung von Antikörpern aus, die nicht nur Hammelblutzellen und die nahe verwandten Ziegenblutzellen sondern auch Rinderblutzellen zu lösen imstande sind. Solche Antikörper, die also durch Hammelblutzellen erzeugt und gegen solche gerichtet sind, bezeichnet man als isogenetische. Die isogenetischen Hammelblutkörper werden andererseits durch Hammelblut vollständig, durch Rinder- und Ziegenblut aber nur teilweise im Versuchsröhrchen gebunden. Es lassen sich aber auch durch Einspritzungen von Zellaufschwemmungen aus Organen von Meerschweinchen, Hund, Katze, Pferd, Huhn, Schildkröte usw. bei Kaninchen hammelblutlösende Antikörper erzeugen, die man zum Unterschied von den isogenetischen, heterogenetische nennt. Diese Antikörper vermögen nicht Rinderblutzellen zu lösen, können aber andererseits außer durch Hammelblut auch durch die zu ihrer Herstellung benutzten Organzellen gebunden werden, was bei den isogenetischen Antikörpern nicht der Fall ist. — Die Hammelblutkörper besitzen zwei Antigene, das eine löst die isogenetischen Antikörper aus, während das andere in den Blutzellen nur in kleinerer Menge vorhanden ist, jedoch hitzebeständig ist und also durch Kochen der Blutzellen rein erhalten werden kann. Dieses kochbeständige Antigen der roten Blutzellen kommt gleichfalls in den Organen der obengenannten Tiere vor und wird, da es die heterogenetischen Antikörper erzeugt, als heterophiles Antigen bezeichnet. Es ist in den Organen von Mensch, Hammel, Kaninchen, Ratte, Rind, Schwein, Taube, Gans, Frosch usw. nicht enthalten. Die erste Gruppe wird als Meer-schweinchengruppe, die zweite als Kaninchengruppe bezeichnet.

Während manche Fragen auf diesem Gebiete wohl eine endgültige Beantwortung, andere eine weitgehende Aufklärung gefunden haben, sind dafür zahlreiche neue Fragen aufgetreten und das Problem der heterophilen Hammelblutantigene ist in enge Berührung mit anderen Fragen, z. B. der Transplantation, der Unterscheidung der Tierarten, der Fett- und Lipoidantikörper getreten,

¹⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforschung 1913. 16, 268.

²⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforschung. 1913. 19, 185.

³⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforschung 1913. 19, 251. Biochem. Zeitschr. 1913. 50, 129.

⁴⁾ Biochem. Zeitschr. 1913. 58, 257.

⁵⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforschung 1913. 19, 235.

⁶⁾ Berl. klin. Wochenschr. 1913. 34, 1557.

⁷⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforschung. 1913. 20, 336. 22, 618.

⁸⁾ Zeitschr. f. Chemotherapie. 1912. 1, 224. Zeitschr. f. Immunitätsforschung 1914. 22, 641.

⁹⁾ Biochem. Zeitschr. 1914. 61, 6.

¹⁰⁾ Biochem. Zeitschr. 1915. 68, 85.

¹¹⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforschung 1914. 21, 565.

¹²⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforschung 1914. 21, 342.

¹³⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforschung 1914. 22, 567.

¹⁴⁾ Biochem. Zeitschr. 1917. 80, 333.

andererseits hatten die Entdeckung von Forßman und die späteren Arbeiten an den Grundlagen der Immunitätswissenschaft gerüttelt und dadurch geholfen, den Begriff der Spezifität zu erweitern und zu vertiefen. Vieles harrt hier noch der Lösung.

Eine der noch ungelösten Fragen ist die nach der Natur dieses so merkwürdig im Tierreich verbreiteten und selbst bei Bakterien der Paratyphusgruppe manchmal vorkommenden (Rothacker) heterophilen Antigens, und die Hoffnung auch dadurch neue Ausblicke auf die Rolle zu gewinnen, welche die Lipide und Fette in der Erzeugung abgestimmter Gegenstoffe spielen, hat mich veranlaßt, mich näher mit den heterophilen Hammelblutantigenen zu befassen, besonders aber mit ihrer Alkohollöslichkeit, die sie mit Lipidstoffen gemeinsam haben.

Neben der Kochbeständigkeit des heterophilen Antigens in den Organzellen hatten Doerr und Pick (loc. cit.) gefunden, daß z. B. in einer Pferdenierenaufschwemmung die Organzellen ihre Fähigkeit die hammelblutlöslichen Stoffe im Kaninchenserum zu binden auch nach wochenlangem Stehen in absolutem öfters gewechselten Alkohol behielten. Andererseits hatten Friedberger und Schiff (loc. cit.) gefunden, daß das heterophile Antigen im Meerschweinchenurin in den alkoholischen Auszug desselben übergeht, aus dem es durch kolloides Eisenhydroxyd nicht gefällt wird. Weitere Untersuchungen durch Friedberger und Suto ¹⁾ mit Pferdeharn, der nach Doerr und Pick ebenfalls heterophiles Hammelblutantigen besitzt, zeigten, daß dasselbe nur in dem alkohollöslichen Teil des Pferdeharns nachweisbar ist und bei Weiterbehandlung konnte es in dem isotonisch gemachten Phosphorsäurefiltrat gefunden werden. Dem obigen Befund von Doerr und Pick über die Alkohollöslichkeit der bindenden Eigenschaft der Pferdenierenzellen steht die Beobachtung von Georgi ²⁾ gegenüber, der fand, daß die Zellen von Meerschweinchenieren durch Alkoholbehandlung ihr Bindungsvermögen (auch ihre antikörperbildende Eigenschaft?) annähernd vollständig verlieren. Georgi konnte weiter nachweisen, daß es mit Alkohol gelingt aus allen Meerschweinchenorganen das heterophile Antigen in Lösung zu bringen. Die Alkohollöslichkeit des heterophilen Hammelblutantigens gewann erhöhtes Interesse als Sachs und Guth ³⁾ zeigten, daß es möglich ist, das heterophile Antigen in den Organen durch Ausflockung der alkoholischen mit NaCl verdünnten Auszüge mit Kaninchen-Hammelblutimmunserum nachzuweisen.

Ich habe nun versucht mit Hilfe dieser Ausflockungsprobe eine Reihe von Fragen über heterophile Antigene zu beantworten, und ich gebe in folgendem einen Bericht über diese Versuche. Äußere und in der gegenwärtigen Zeit begreifliche Umstände haben mich verhindert meine Untersuchungen auch an Pferden, Schweinen, Ziegen, Hühnern usw. anzustellen, so daß die Zahl der Tierarten, die in den Kreis der Untersuchungen gezogen wurden, nur gering ist. Jeder Versuch ist mehrmals angestellt worden.

¹⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforschung 1919. 28, 217.

²⁾ Arb. a. d. Inst. f. exper. Ther. u. d. Georg Speyer-Hause zu Frankfurt a. M. 1919. H. 9. S. 33.

³⁾ Med. Klinik 1920. Nr. 6.

I. Verhalten sich die Organe des Meerschweinchens verschieden in bezug auf die Ausflockung ihrer alkoholischen Auszüge durch Hammelblutkaninchen serum?

Ich habe zuerst festzustellen versucht, ob in bezug auf die Ausflockung der alkoholischen Auszüge der Meerschweinchenorgane mit Kaninchenhammelblutantisera die einzelnen Organe Unterschiede aufweisen. Dies war von vorneherein wahrscheinlich, nachdem bereits Forßman und nach ihm andere Autoren beobachtet hatten, daß die hämolysinbildende Fähigkeit der Organe des Meerschweinchens ebenso verschieden stark war, wie ihre Eigenschaft die Hämolysine der Immunsera zu binden. Beides fehlte z. B. den Blutzellen vollständig.

Zur Technik der Versuche sei folgendes bemerkt:

Die frischen Meerschweinchenorgane wurden gewogen und dann mit Schere und Messer zerkleinert und später im Mörser fein zerrieben. Die Organe stammten von entbluteten, aber nicht vollständig ausgebluteten Meerschweinchen. Eine völlige Blutfreiheit der Organe wurde im allgemeinen, wenn nicht besonders vermerkt, nicht erstrebt. 1 g Substanz wurde dann mit 5 ccm 96%igem Alkohol versetzt und unter öfterem Schütteln für 1—4 Tage bei Zimmertemperatur vor Licht geschützt aufbewahrt. Der klar filtrierte alkoholische Auszug wurde dann in Anlehnung an die Methodik von Sachs und Guth mit 0,9% NaCl-Lösung langsam unter tropfenweisem Zusatz im Verhältnis 1:6 verdünnt. — Im allgemeinen wurde dann je 0,5 ccm Auszug mit fallenden Mengen eines käuflich von den Höchster Farbwerken bezogenen Kaninchen-Schafbluthämolysins versetzt und das Volumen auf 1,5 ccm gebracht. Nach Durchschütteln standen die Röhrchen für 12—16 Stunden bei 37°. Die Ablesung der Flockung geschah mit dem Agglutinoskop. Je nach dem Grade der Flockung wurden die Bezeichnungen + + + + + + + + + ± — gewählt.

Versuch I.

0,5 ccm Extrakt- verdünnung		Meerschweinchenorgane								
		Niere	Neben- niere	Hoden	Milz	Herz	Skelett- muskel	Leber	Fett	rote Blutzellen
+ Kaninchen- schafblut- antiserum in 1 cc NaCl-Lösg.	0,025	++++	++++	+++	++++	++++	+++	±	—	±
	0,01	++++	+++	+++	++++	++++	+++	±	+	+
	0,05	++++	+++	+++	++++	++++	+++	±	++	±
	0,1	+++	++	++	++	++	++	—	—	—
NaCl-Lös.	1,0	—	±	—	—	—	—	—	—	—

Ein wesentlicher Unterschied in dem Grade der Ausflockung besteht zwischen den Alkoholauszügen von Niere, Hoden, Milz, Herz und Skelettmuskel nicht. In späteren Versuchen wurde noch Lunge mituntersucht, deren Auszüge zu

den am stärksten ausflockenden gehören. Nebennierenauszüge wiesen sehr häufig Neigung zu Eigenflockung mit NaCl-Lösung auf. Das gleiche konnte ich auch oft bei Leberauszügen beobachten. Auffallend ist die sehr geringe oder überhaupt nicht auftretende Ausflockung bei Leber, Fettgewebe und serumfreien Blutzellen.

Auch in Immunisierungsversuchen mit Organzellen erwiesen sich, von vereinzelten Beobachtungen Forßmans (loc. cit) abgesehen, die Leberzellen als die ungeeignetsten, wiewohl die Möglichkeit der Schafbluthämolysinerzeugung beim Kaninchen auch mit Meerschweinchenleberzellen feststeht. Dagegen hatten sich in allen darauf hinielenden Versuchen die Blutzellen als unfähig gezeigt Schafbluthämolysine zu erzeugen. Auch nach der Ausflockungsprobe muß ihnen ein heterophiles Antigen abgesprochen werden. Die Spur Ausflockung, die der Versuch I erkennen ließ, kann auf Rechnung der Leukozyten, die nach Spät (loc. cit.) und Resten von Serum, das nach Orudschiew (loc. cit.) hämolysinbildende Eigenschaften besitzen, gesetzt werden.

Das auffallende Ansteigen der an und für sich geringen Ausflockung des alkoholischen Fettauszuges mit fallender Immunserummenge wurde nur einmal beobachtet. Sonst tritt mit Fett oft von selbst eine Ausflockung mit NaCl-Lösung ein, die durch Serumzusatz in gewissem Grade gehemmt wird, wie in einer früheren Arbeit gezeigt werden konnte (Much und Schmidt¹⁾).

Versuche dieser Art glücken nicht immer. Selbst bei genau gleichhaltener Technik trifft man Organe, die keine oder nur sehr geringe Ausflockung geben. Immerhin gehören die Niere, die Lunge und das Herz zu den Organen, die am sichersten brauchbare Auszüge mit Alkohol geben. Einen in jeder Hinsicht befriedigenden Grund für diese Verschiedenheiten vermag ich zur Zeit nicht anzugeben. Es ist, wie später gezeigt wird, das Verdünnungsverhältnis 1:6 nicht immer das Optimum für die Ausflockung. Vielleicht waren auch die käuflich bezogenen Schafblutimmunsera in dieser Hinsicht nicht gleichwertig, obwohl ihre hämolytische Kraft stets sehr gut war. Doch geht diese, wie spätere Versuche zeigen, der ausflockenden Wirkung nicht streng parallel.

Daß die Meerschweinchenleber von allen untersuchten Organen die am schlechtesten flockenden Auszüge liefert, könnte seinen Grund darin haben, daß Spuren von Gallensäuren in dem Lebergewebe mit in den Auszug gehen und durch ihre Beeinflussung der Oberflächenspannung das Zustandekommen der Flockung beeinträchtigen. Folgende Niederschrift gibt einen daraufhin angestellten Versuch wieder.

Versuch II.

0,05 ccm Kaninchen-Schafblutimmunserum in 0,5 ccm Volum

a)	b)	c)
+ 0,5 ccm	desgl.	Kontrolle
Meerschweinherz-	+ 2 Tropfen Meerschwein-	(ohne Serum)
extrakt 1:3,5 verd.	Galle	sonst = b.
++++	++	++

Der Versuch zeigt, daß zwar eine beträchtliche Abnahme der Flockung eintreten kann, daß jedoch andererseits der Auszug mit Galle selbst stets Aus-

¹⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforschung 1921, 31, 169.

flockung gab. In manchen Fällen könnte also in der Tat die Anwesenheit von Galle in dem Leberauszug sowohl die geringe Flockung veranlassen als auch die Eigenflockung erklären. Wie später gezeigt wird, ist der Zusatz eines die Oberflächenspannung herabsetzenden Stoffes in der Lage eine sonst auftretende Flockung zu unterdrücken. (Vgl. Abschnitt VIII E.)

In Übereinstimmung mit der Fähigkeit Schafbluthämolysine beim Kaninchen zu erzeugen und die Schafblutimmunstoffe zu binden, hat die Ausflockungsprobe gezeigt, daß in allen Organen des Meerschweinchens das heterophile Hammelblutantigen vorhanden ist, mit Ausnahme der roten Blutzellen und des Fettgewebes. Verhältnismäßig am geringsten ist das Antigen in der Leber enthalten.

II. Geben alkoholische Auszüge aus Organen anderer Tiere mit Kaninchen-Schafbluthämolysin eine Ausflockung?

Es galt nun weiter zu untersuchen, ob auch die Organe anderer Tiere in gleicher Weise wirken, und ob es gelingt mit Hilfe der Ausflockungsprobe die Tiere in zwei Gruppen einzuteilen, je nachdem sie in ihren Organen das heterophile Antigen enthalten (Meerschweinchengruppe) oder nicht (Kaninchengruppe). Zur Meerschweinchengruppe gehören unter anderen Tieren: Hund, Katze, Pferd, Huhn, Maus (?); zur Kaninchengruppe außer Kaninchen noch Hammel, Ratte, Rind, Schwein sowie der Mensch. Im übrigen verweise ich auf die Zusammenstellung der beiden Gruppen in der Arbeit von Friedberger und Goretti¹⁾.

Zur Beantwortung der Frage, ob auch die alkoholischen Auszüge der Organe von anderen Tieren diese Ausflockung geben, standen mir nur die Organe von Mensch, Ratte, Hund, Katze, Kaninchen und Maus zur Verfügung.

Die Organe wurden in gleicher Weise wie oben beschrieben, mit Alkohol ausgezogen und der 1:6 verdünnte Auszug mit Kaninchen-Schafbluthämolysin auf Flockung geprüft. Alle Versuche wurden mehrmals angestellt und ergaben im großen ganzen übereinstimmende Ergebnisse, wenn auch in dem Grade der Ausflockung Verschiedenheiten auftraten, wie sie ja auch beim Meerschweinchen zu beobachten waren. In der folgenden Versuchsniederschrift sind der besseren Übersicht halber, die einzelnen Versuche zusammengestellt worden, wobei zu bemerken ist, daß für jeden Einzelversuch eine neue Probe des Höchster Hammelhämolysins verwendet wurde.

Von den untersuchten Tieren gaben die Organe von Ratte, Kaninchen und Mensch keine oder nur geringe Ausflockung, während die Organauszüge von Katze und Hund ausflockten. Bei diesen letzteren Tieren waren allerdings bedeutende Unterschiede in den einzelnen Organen vorhanden, indem von der Katze Herz und Lunge und von dem Hund die Lunge die besten Flockungen gaben. In anderen Versuchen erzielte auch die Niere gute Flockungen, jedoch waren die Lungenauszüge am wirksamsten. Die Flockung mit dem Hundelungenauszug war die stärkste Flockung, die ich überhaupt beobachtete. Es

¹⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforschung 1914. 21, 91.

ist in diesem Zusammenhang interessant, daß die Lunge auch von allen Organen bei Einspritzungen am giftigsten wirkt.

Besonderes Interesse beansprucht in Hinsicht auf die Ausflockung die weiße Maus.

Versuch III.

0,05 ccm Kaninchenimmunsersum + 0.5 ccm Extraktverdünnung in 1,5 ccm Gesamtvolumen. Ausflockung nach 12 Stunden bei 37°.

	Leber	Niere	Nebenniere	Milz	Herz	Lunge	Hoden	Skelettmuskel	Fett	
Serum . .	+	++	+++	±	++++	++++			+	Katze
Kontrolle .	±	±	+++	—	—	—			+	
Serum . .	±	—	—	—	—	—	—	—	+	Ratte
Kontrolle .	—	—	—	—	—	—	—	±	+	
Serum . .	—	—	+	—	+	++++			±	Hund
Kontrolle .	—	—	+	—	—	—			++	
Serum . .	—	—	±	—	±	—	—		±	Mensch
Kontrolle .	—	—	—	—	+	—	—		+	
Serum . .	+	+	—	+	+	±		+		Kaninchen
Kontrolle .	—	—	—	—	—	—		—		

Bail und Margulis (loc. cit.) sahen in der weißen Maus auf Grund des Bindungsvermögens ihrer Organe für Schafbluthämolysine einen Übergang der Meerschweinchen zur Kaninchengruppe. Morgenroth ¹⁾ und Morgenroth und Bieling (loc. cit.) fanden, daß die Immunisierung von Kaninchen mit Organ- und Geschwulstzellen der weißen Maus Hammelbluthämolysine liefert. Von den Organen erwies sich Niere besonders geeignet. Von Leber waren sehr große Mengen nötig. Auf Grund weiterer Beobachtungen über die „primäre Giftigkeit“ der heterogenetischen Antisera kam Morgenroth zu der Annahme, daß die Mauszelle nur sehr wenig heterophiles Antigen besitzt. Doerr und Pick (loc. cit.) fanden gleichfalls Schwierigkeit die weiße Maus einzureihen, nachdem sie bei Immunisierungs- und Bindungsversuchen feststellten, daß nur Niere, Skelettmuskel und Herz antigenhaltig waren. Nicht antigenhaltig waren Gehirn, Leber und rote Blutzellen.

Dementsprechend fand ich bei manchen weißen Mäusen eine sehr schwache Flockung mit Herz, Nieren, Muskeln, Milz und Nebennieren, bei den meisten, jedoch keine Flockung, so daß ich nach dem Ausfall der Flockung geneigt bin, die weiße Maus dem Kaninchentypus einzureihen. Da jedoch erwiesenermaßen die Nieren, Herz und Skelettmuskel der weißen Maus heterophile Antigene, wenn auch in geringem Maße besitzen, so würde daraus folgen, daß die Ausflockungsmethode wenigstens in der beschriebenen Ausführung eine weniger

¹⁾ Berl. klin. Wochenschr. 1913. H. 12.

brauchbare Methode darstellt um heterophiles Hammelblutantigen nachzuweisen, als der Immunisierungs- oder der Bindungsversuch ¹⁾).

Immerhin folgt aus dem Versuch III, daß sich die untersuchten Tiere nach der Ausflockbarkeit ihrer alkoholischen Organauszüge in die gleichen Gruppen einreihen ließen, die oben als Meerschweinchen- und Kaninchengruppe unterschieden wurden.

Es wäre sicher sehr interessant diese Versuche an größerem Tiermaterial auszudehnen, wie es z. B. die zoologischen Gärten besitzen, um so mehr, als diese Flockungsprobe, dadurch daß die Antigene alkohollöslich sind und, wie wir später sehen werden, auch die Kochhitze vertragen, wahrscheinlich gestattet, auch noch die Organe von toten Tieren zu benutzen.

III. Gibt auch das normale Serum von Kaninchen, anderen Tieren oder Menschen Ausflockungen mit alkoholischen Organauszügen der verschiedenen Tiere?

Um die mit Kaninchen-Schafblutimmunserum beobachtete Ausflockung der alkoholischen Auszüge von Organen der Tiere der Meerschweinchengruppe als abgestimmt bezeichnen zu können, muß außer dem Nachweis, daß eine Ausflockung mit Organauszügen aus der Kaninchengruppe nicht eintritt, noch gezeigt werden, daß das Serum normaler Kaninchen wie auch normale Sera anderer Tiere oder des Menschen mit den Alkoholauszügen der Organe der Meerschweinchengruppe keine Ausflockung geben.

Es ist bekannt, daß Kaninchen und Menschen Normalhämolysine für Hammelblut enthalten können und nach den Untersuchungen von Friedemann (loc. cit.) wissen wir, daß die sogenannten Normalhämolysine dem heterogenetischen und nicht dem isogenetischen Antikörper entsprechen. Da nun nach Sachs und Guth (loc. cit.) auch heterogenetische Schafblutimmunsera mit den Alkoholauszügen der Meerschweinchenorgane eine Ausflockung geben, so war es von vorneherein nicht unwahrscheinlich, daß auch das Serum von Menschen und Kaninchen, sofern normalhämolysinhalrig, mit alkoholischen Auszügen aus Organen der Meerschweinchengruppe ausflocken würde. Andererseits enthalten viele menschliche Sera auch Hämolysine für Meerschweinchenblutzellen und sind also gegenüber den Organauszügen der Kaninchengruppe in einer ähnlichen Stellung, wie die Organauszüge der Meerschweinchengruppe dem Normalschafhämolysin des Kaninchens gegenüber. Es wäre also auch möglich, daß die Sera mancher Menschen mit Organauszügen von Kaninchen oder anderer Tiere der gleichen Gruppe Ausflockung geben. Immerhin wäre zu erwarten, daß eine Ausflockung mit normalhämolysinhalrigem Sera dem Grade nach sehr hinter der mit Immunsera zurücksteht.

Es wurden die Sera von normalen Kaninchen, Meerschweinchen, Menschen, Ratte, Hund und Hammel gegenüber den alkoholischen Auszügen der Organe fast aller untersuchten Tiere geprüft. Die Ergebnisse der Versuche waren nicht gleichmäßig, sondern wiesen, wenn auch nicht große Verschiedenheiten auf.

¹⁾ Die Versuche würden wahrscheinlich mit heterogenetischem Kaninchen-Hammelantiserum einen schärferen Ausschlag geben.

In den meisten Versuchen war jedoch der Ausfall der Ausflockung negativ. Es erübrigt sich die Versuchsniederschriften im einzelnen anzuführen. Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenstellen:

Normales Kaninchenserum (0,1 ccm, aktiv und inaktiv) gab keine Flockungen mit den alkoholischen Organauszügen von Meerschwein, Kaninchen, Ratte und Katze. Dies bestätigt die bereits von Sachs und Guth gemachte Beobachtung. Diese Autoren fanden allerdings bei Verwendung von größeren Mengen (0,5—0,15) Kaninchenserum ebenfalls Ausflockung mit Meerschweinchenorganauszügen, was sie als mögliche Normalhämolysinwirkung auffassen.

Normales Meerschweinchenserum (0,1 ccm aktiv und inaktiv) gab keine Flockung mit den alkoholischen Organauszügen von Meerschweinchen, dagegen konnte ich gelegentlich deutliche Flockungen mit Kaninchenorganauszügen (Blut, Lunge und Herz) erhalten. Ferner beobachtete ich einmal bei Verwendung von 0,2 ccm aktivem Serum eine deutliche Flockung mit zweifachem, nach vorausgegangener Ätherbehandlung mit Alkohol ausgezogenem, Katzenlungenauszug, der selbst keine Flockung mit NaCl-Lösung zeigte. Sonst sah ich mit normalem Meerschweinchenserum keine Flockungen mit Organauszügen anderer Tiere (Hund, Ratte, Mensch) eintreten.

Rattenserum erwies sich soweit geprüft (0,1 ccm aktiv und inaktiv) als unfähig mit Organauszügen von Meerschweinchen, Katze, Hund, Mensch auszuflocken.

Mit 0,2 ccm Hundeserum, aktiv und inaktiv, beobachtete ich gelegentlich Flockungen mit Kaninchennebenniere und mit Meerschweinchennebenniere. Letztere Ausflockung war ebenso stark als mit 0,1 ccm Kaninchen-Hammelblut-hämolysin; dabei wiesen beide Nebennierenextrakte keine Eigenflockung auf.

Hammelserum, 0,1 ccm aktiv, gab mit Kaninchenherz- und Katzenorganauszügen Ausflockungen, die noch stärker waren bei Verwendung größerer Serummengen (bis 0,1 ccm) und dann die gleichzeitig angestellten Flockungen mit 0,05 ccm Kaninchenimmunserum übertrafen.

Diese Beobachtungen konnten nicht immer gemacht werden, was wohl auf individuellen Verschiedenheiten sowohl der Organe, aus denen der Auszug hergestellt wurde, wie auch der verwandten Sera beruht.

Besonders interessant ist das Verhalten des Menschenserums. Im allgemeinen gibt 0,1 ccm Menschenserum aktiv und inaktiv in der bei Versuch I erwähnten Versuchsordnung keine Flockungen mit den Organauszügen von Meerschwein, Kaninchen, Ratte, Katze, Mensch und Hund. Ich hatte jedoch Gelegenheit zu beobachten, daß sogar starke Flockungen mit Meerschweinorganauszügen besonders von Muskel und Niere auftreten können. Dies beobachtete ich mehrere Male bei Seren, die eine positive Wassermannprobe gaben und die gleichfalls mit Pferdeherzauszug nach Meinickes D. M.-Probe starke Flockung gaben. Es ist in diesem Zusammenhang bemerkenswert, daß das Pferd zu den Tieren der Meerschweinchengruppe gehört. Andere Pferdeorgane standen mir leider nicht zur Verfügung. Prüft man jedoch mit größeren Mengen Meerschweinchenserum, so beobachtet man mit steigender Auszugsverdünnung regelmäßig das Auftreten von Flockungen, wobei öfters optimale Verhältnisse zum Ausdruck zu kommen scheinen, wie folgender Versuch zeigt:

Versuch IV.

Ein alkoholischer Meerschweinchenmuskelauszug wird gegenüber Menschenserum und gegenüber Kaninchen-Schafblutimmunserum geprüft.

A.

Variierung der Emulsionsstärke.

0,5 ccm Auszug + Serum im Gesamtvolumen 1,5 ccm.

1 Teil Auszug wird verdünnt in

Teilen NaCl-Lösung	1	2	4	5	7,5	10	15	20	40
+ 0,05 Kaninchenimmunserum	+++ trüb	+++	++	++	++	+	+	±	—
+ 0,25 aktives Menschenserum	— trüb	—	—	—	+	++	+++	+++	+
+ 0,5 ccm NaCl	— trüb	—	—	—	—	—	—	—	—

B.

Variierung der Serummenge.

0,5 ccm 1:6 verd. Auszuges (Gesamtvolumen 1,5 ccm.)

+ Serum ccm . .	1,0	0,75	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0
Immunserum . .	±	±	±	—	+++	++	++	±	—	—
Menschenserum .	±	±	±	—	—	—	—	—	—	—

Dieser Versuch zeigt, daß in den Auszugsverdünnungen, mit denen 0,5 ccm Immunserum eine Flockung erzeugt, selbst die fünffache Menge Menschenserum keine Flockung gibt. Umgekehrt gibt 0,25 ccm Menschenserum auch da noch Flockungen, wo 0,05 ccm Immunserum versagte. Es ist für diesen Versuch ohne Belang, ob das Menschenserum aktiv oder inaktiviert gebraucht wird. Mit anderen Menschensera habe ich in der Menge von 0,2 ccm noch mit 80fach verdünntem Auszug von Meerschweinchenorganen deutliche Flockung erhalten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es unter geeigneten Versuchsbedingungen wohl möglich ist, mit anderen normalen Seren in alkoholischen Organauszügen der verschiedenen Tiere Flockungen zu erzielen, die manchmal an Stärke die mit Immunserum erzielten erreichen können. Wählt man jedoch die Anordnung des Versuches I, so tritt mit anderen Normalseren keine oder höchstens eine geringgradige Ausflockung auf, die sich sehr in ihrer Stärke von der mit Immunserum erzielten unterscheidet. Unter diesen Bedingungen kann letztere als eine abgestimmte Wirkung zwischen heterophilen Hammelantigenen und Kaninchen-Schafblutimmunserum angesehen werden.

IV. Geben Hammelblutantisera anderer Tiere Flockungen mit alkoholischen Organauszügen?

Hammelblutantisera können einmal durch Hammelbluteinspritzungen gewonnen werden. Solche isogenetischen Sera lassen sich bei allen Tieren der Kaninchengruppe erzeugen und unter diesen gehört das von Höchst bezogene, das, wie wir sahen, gute, aber nicht gleichmäßige Flockungen gibt. — Iso-genetische Hammelblutantisera lassen sich aber auch durch Einspritzungen von Hammelblut bei Tieren der Meerschweinchengruppe erzeugen. Solche Sera unterscheiden sich von den isogenetischen der Kaninchengruppe, insofern sie keine heterogenetischen Antikörper besitzen können, letztere werden an die Organzellen im lebenden Tier gebunden. Der weiter unten besprochene Versuch X zeigt, daß ein isogenetisches Meerschweinchen-Hammelblutantiserum keine flockenden Eigenschaften mit alkoholischen Lösungen des heterophilen Antigens besitzt. — Für die Erklärung sei auf den Abschnitt VII dieser Arbeit verwiesen. Das durch Meerschweinchenorganzellen bei Kaninchen erzeugte heterogenetische Hammelblutantiserum hat sehr starke flockende Eigenschaften, wie gleichfalls der Versuch X zeigt, und auch Sachs und Guth (loc. cit.) bereits beschrieben.

V. Sind getrocknete Organe den frischen vorzuziehen und läßt sich das heterophile Antigen auch mit anderen Mitteln ausziehen?

In den vorstehenden Versuchen waren die frischen Organe mit 96%igem Alkohol ausgezogen worden. Aber man kann auch andere Ausziehungsmittel benutzen. So erwähnt Georgi (loc. cit.), daß das heterophile Antigen in den Meerschweinchenorganen auch der Einwirkung von Äther und Chloroform widersteht.

Ich berichte im folgenden über Versuche, die angestellt wurden, um zu sehen, ob andere Mittel als Alkohol gleichfalls zu Auszügen führen, die für die Ausflockungsprobe brauchbar sind. Eine Unbrauchbarkeit für die Ausflockung ist auf jeden Fall nicht gleichbedeutend mit der Frage nach der Löslichkeit des heterophilen Antigens in dem betreffenden Mittel, denn für das Zustandekommen der Ausflockung sind eine Reihe anderer rein physikalisch-chemischer Einflüsse mit verantwortlich. Bei diesen Versuchen wurde ferner untersucht, ob getrocknetes Organpulver ein besseres Ausgangsmaterial für den Auszug darstellt, als die frischen Organe.

Die Organe eines Meerschweinchens wurden feinstens zerrieben und bei 60° getrocknet. Der Rückstand pulverisiert. Von diesem Pulver wurde 1 g mit 5 ccm Äther versetzt und bei Zimmertemperatur 5 Tage stehen gelassen. Dann wurde der Äther klar abgegossen und verdunstet. Der Ätherrückstand wurde in je 5 ccm Alkohol aufgenommen. Das mit Äther ausgezogene Organpulver wurde mit Äther einmal gewaschen, dann getrocknet und einer erneuten Ausziehung mit Alkohol unterzogen im gleichen Verhältnis wie vordem mit Äther. Bei der nun folgenden langsamen Verdünnung mit NaCl-Lösung trübten sich die alkoholischen Rückstandslösungen sehr stark, so daß dieselben im Verhältnis 1:11 verdünnt wurden. Die sekundären alkoholischen Auszüge wurden 1:6 verdünnt, wobei nur geringe Trübung und meistens nur Opaleszenz auftrat.

Versuch V.

0,5 ccm der Auszugsverdünnungen wurde mit 0,05 ccm Kaninchen-Schaffblutantisera im Gesamtvolum 1,5 ccm versetzt und die Flockung nach 12 h bei 37° abgelesen. Die Kontrolle enthielt 1,0 NaCl-Lösung + 0,5 ccm Auszug.

Meerschweinchenorgan		Leber	Hoden	Niere	Herz	Lunge	Milz	Nebenniere
Alkoholische Ätherückstand-Lösung 1:10 verdünnt	Immunserum	—	+++ trüb	+++ trüb	—	+	±	—
	Kontrolle . .	—	+++ trüb	+++ trüb	—	++	+	—
Sekundärer Alkoholauszug 1:6 verdünnt	Immunserum	+	++	—	++++	++++	+	++
	Kontrolle . .	+	+	—	—	—	++	+

Die alkoholischen Ätherückstandslösungen trübten sich auf NaCl-Zusatz sehr stark und flokten teilweise bereits nach einer Stunde von selbst aus. Daher mußten Leber-, Herz- und Nebennierenauszugsverdünnungen vor Gebrauch noch durch Papier filtriert werden. — Es ist wohl diesem Umstande zuzuschreiben, daß Leber, Herz und Nebenniere keine Flockung gaben.

Der Versuch zeigt, daß die alkoholische Lösung des Ätherückstandes mit Immunserum eine im allgemeinen geringere Ausflockung gibt, wie mit NaCl-Lösung allein. Der Äther hat offenbar die Fette und Lipotide zum größten Teil gelöst. Daher ist die alkoholische Lösung seines Rückstandes reicher an diesen Bestandteilen als der gewöhnliche primäre Alkoholauszug und erst recht reicher als der sekundäre Alkoholauszug der Organe. Diese Fette und Lipoidstoffe neigen in NaCl-Lösung emulgiert zur Selbstflockung, die bei manchen Auszügen sehr schnell eintritt. Durch Serumzusatz wird diese Flockung in gewissen Grenzen verhindert. Man muß daher den Ausflockungsvorgang mit Ätherauszugslösungen als unabgestimmt auffassen. Der sekundäre alkoholische Auszug gab dagegen, besonders bei Herz und Lunge in Versuch V, sehr gute Ausflockungen bei klaren Kontrollen. Ich fand jedoch gelegentlich anderer Versuche, daß solche Auszüge größere Neigung haben mit Normalserum zu flokten, als die aus frischen Organen hergestellten primären Alkoholauszüge.

Weiter wurden vergleichende Untersuchungen mit Chloroform, Ligroin, Äther, Toluol als Lösungsmittel angestellt.

Von einem Pulver, das aus mehreren getrockneten Meerschweinchennieren hergestellt war, wurde je 1 g mit 7 ccm 96% Alkohol, Chloroform, Ligroin, Äther und Toluol bei Zimmertemperatur für 2 Tage ausgezogen, dann wurde abfiltriert und zur Trockene eingedampft, was mit Ligroin und Toluol sehr schwierig war. Der Rückstand wurde unter Erwärmen in je 10 ccm Alkohol gelöst, wobei von dem Äther-, Toluol- und Chloroform-Rückständen ein Teil unlöslich blieb. Die alkoholischen Lösungen wurden tropfenweise mit NaCl-Lösung verdünnt, und zwar der Alkoholauszug 1:6, wobei die Emulsion schwach opal wurde. Die anderen alkoholischen Lösungen der Rückstände wurden 1:20 verdünnt und die Emulsionen wurden stark trübe, und zeigten (Versuch VI) sämtlich Eigenflockung.

Versuch VI.

0,5 ccm der Auszugsverdünnungen wurden mit fallenden Dosen Kaninchenhammelblut-
antiserum im Gesamtvolum 1,5 ccm versetzt. Ausflockung nach 12h bei 37°.

	primärer Alkohol- auszug	Alkoholische Lösungen der Rückstände von den Auszügen mit					frische Meer- schweinchen- niere 1:6 aus- gezogen mit Azeton
		Chloro- form	Ligroin	Äther	Toluol	Azeton	
Verdünnungsverhältnis Aussehen	1:6 schwach opal	1:20 dichte Trüb.	1:20 dichte Trüb.	1:20 dichte Trüb.	1:20 dichte Trüb.	1:6 deutl. opal	1:6 gering opal
Kaninchenimmunsrum							
0.1 cc	+	++	+	++	+	++	+
0.05 „	++	++	++	++	+	+	—
0.025 „	+	++	+	++	±	±	—
1.0 ccm NaCl-Lösung	—	±	+	++	±	—	—

Aus dem Versuch VI geht hervor, daß die gut Fett und Lipoid lösenden Mittel für die Anstellung der Ausflockungsprobe ungeeignet sind, da sie sämtlich von selbst zur Flockung neigen. Ob diese auch das heterophile Antigen aus den Organen lösen, vermag man aus dieser Versuchsanordnung nicht zu schließen. — Jedenfalls möchte ich in Übereinstimmung mit Georgi dem Chloroform die Fähigkeit zuschreiben das heterophile Antigen zu lösen, denn obwohl meiner Erfahrung nach Serumzusatz die Eigenflockung der Kochsalzemulsionen dieser Auszüge hemmt, so war im Falle von Chloroform die Flockung mit Immunsrum stärker ausgefallen, als die Eigenflockung. Ein Azetonauszug aus frischer Meerschweincheniere zeigte schwache Ausflockung mit Immunsrum. Auch der Azeton hat demnach wohl auch die Fähigkeit das heterophile Antigen zu lösen. Aber er ist entschieden weniger brauchbar als Alkohol. Azetonauszüge aus getrockneten Organen haben die gleichen Nachteile wie die Ätherauszüge.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß für die Ausflockungsprobe mit Schafblut-Kaninchenimmunsrum im allgemeinen frische Organe den getrockneten vorzuziehen sind, daß ferner Alkohol das beste Lösungsmittel ist, während andere Lösungsmittel wie Äther, Ligroin, Toluol, Chloroform, Azeton in ihren Rückstandslösungen in Alkohol mit NaCl-Lösungen Eigenflockung geben.

VI. Läßt sich das heterophile Antigen aus Organen in NaCl-Lösung lösen und durch Ausflockung mit Kaninchen-Schafbluthämolysin nachweisen?

Bereits Forßman und Hintze ¹⁾ hatten versucht das heterophile Antigen an den Organen von Meerschweinchen in NaCl-Lösung zu bringen und dessen

¹⁾ Biochem. Zeitschr. 1912. 44. 336.

Gegenwart mittels Ausflockung durch isogenetisches und heterogenetisches Schaffblut-Kaninchenhämolysin nachzuweisen. Beim Überschichten der Sera mit 10-, 100-, 1000-fach verdünntem Meerschweinchennierenkochsalzauszug erhielten sie nach 48stündigem Stehen bei 25° schwache Trübung in allen Röhrchen, aber diese trat ebenfalls nicht nur mit Auszug aus Schweinenieren, also aus einem Organ, das kein heterophiles Hammelblutantigen enthält, auf, sondern auch mit normalem Kaninchen- und normalem Schweineserum. Die Probe war demnach nicht abgestimmt. Bei anderer Versuchsanordnung gelang es jedoch Friedberger und Collier¹⁾ durch Vorbehandlung mit heterogenetischem Eiweiß einen hammeleiweißausflockenden Stoff bei Kaninchen nachzuweisen, aber dies gelang ihnen nicht mit dem Eiweiß aller der Tierarten, die Hammelhämolysin bilden. Dagegen sollten die oben erwähnten Versuche von Forß man nicht Hammeleiweiß als solches, sondern das heterophile Hammelblutantigen in Organen anderer Tiere durch Ausflockung nachweisen. Das Letztere bezweckten auch meine eigenen Versuche.

Es wurden Meerschweinchenorgane zerkleinert und mit 0,5% Phenol enthaltender NaCl-Lösung versetzt. Nach viertägigem Stehen bei Zimmertemperatur, wobei des öfteren umgeschüttelt wurde, wurde klar abgeschleudert und die überstehende Flüssigkeit abgefüllt. Abgesehen von dem opaleszierenden Hodenauszug und dem etwas blutig gefärbten Leberauszug, waren die Auszüge klar, hatten sich aber bereits am folgenden Tage unter teilweiser Flockung von neuem getrübt. Der Versuch wurde deshalb mit Meerschweinchenorganen wiederholt, deren Auszüge diesmal nicht so lange gestanden hatten. 0,5 ccm Immuneserum in 0,5 ccm Volumen NaCl-Lösung wurde mit je 0,5 ccm der klar geschleuderten 0,5% Phenol enthaltenden Kochsalzauszüge überschichtet. Weder nach 12stündigem Stehen bei Zimmertemperatur noch nach 6stündigem Aufenthalt im Brutschrank war eine erkennbare Ausflockung aufgetreten. Der Versuch wurde mit einem neuen Meerschweinchennierenauszug nochmals angesetzt. Hier kam es bei derselben Versuchsanordnung bei der Überschichtung zu einer deutlichen, bei der Durchmischung zu einer sehr schwachen Flockung, aber auch die Kontrolle ohne Kaninchen Serum wies eine Flockung auf. Ein weiterer Versuch wurde mit frischer entbluteter Hundelunge angestellt. Diesmal wurde der Kochsalzauszug durch eine Berkefeldtkerze klar filtriert. Das Filtrat wies jedoch am anderen Tage einen Bodensatz auf. Die klar überstehende Flüssigkeit wurde nun vorsichtig über 0,1 ccm unverdünntes Kaninchenimmuneserum geschichtet. Nach einigen Stunden bei 37° war eine sehr geringe Flockung bemerkbar, die bei normalem Kaninchen Serum und in der Auszugskontrolle ohne Serum ausgeblieben war. Die Flockung war jedoch zu gering um als eine abgestimmte aufgefaßt zu werden.

Es scheint demnach, daß zum Zustandekommen der Flockung des heterophilen Antigens in den Organen der Tiere der Meerschweinchengruppe mit Kaninchen-Schaffbluthämolysin, die Gegenwart von alkohollöslichen Stoffen (Lipoiden) unbedingt nötig ist. Es bleibt noch zu beweisen, daß das heterophile Antigen tatsächlich an die Lipide geknüpft ist. Auf diese Frage komme ich weiter unten zurück.

¹⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforschung 1919. 28, 237.

VII. Zur Frage der Abgestimmtheit der Ausflockung.

Abhängigkeit der Flockung vom Hämolysegehalt des Immunsersums.

Hat ein Kaninchen-Schafblutimmunserum mit dem alkoholischen Auszug eines Meerschweinchenorgans geflockt, so wäre zu erwarten, wenn in den Organen des Meerschweinchen auf gleiche Mengen Organzellen auch gleiche Mengen heterophiles Antigen kämen, daß das gleiche Serum nicht noch einmal mit einem Meerschweinchenorgan flocken würde, ja es wäre auch zu erwarten, daß auch mit Organen anderer Tiere nicht eine neue Flockung eintreten kann, da man ja doch annehmen muß, daß das heterophile Antigen etwas ist, das in gleicher Form in den Organzellen aller Tiere der Meerschweinchengruppe vorhanden ist.

Um diese Frage zu beantworten, wurden mehrere Versuche angesetzt. Einige gaben ein weniger eindeutiges Ergebnis. Ich gebe im folgenden die Niederschrift eines einwandfrei abgelaufenen Versuches.

Versuch VII.

A. 0,7 ccm Kaninchen-Schafbluthämolyse wurde auf 7 ccm mit NaCl-Lösung verdünnt und dazu 3,5 ccm einer 1:6 mit NaCl-Lösung hergestellten Verdünnung eines alkohol. Meerschweinchennierenauszuges gegeben.

Nach 12h bei 37° wurden die massigen Flocken abgeschleudert und mit der klaren überstehenden Flüssigkeit der Versuch B angesetzt.

B. Je 1 ccm der klaren Flüssigkeit wurde mit 0,5 ccm Auszugsverdünnung (wie bei Versuch I) versetzt. Flockung nach 12h bei 37°.

	Hund	Meerschwein-			Katze	
	Lunge	Herz	Lunge	Niere	Lunge	Herz
1 ccm klare Flüssigkeit von A = 0.06 Immunserum	++++	++++	++++	+	++++	++++
Unvorbehandeltes Immun- serum 0.05 ccm im Volumen						
1 ccm	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1,0 ccm NaCl	—	—	—	—	—	—

C. Hämolyse von 0,5 ccm 5% Hammelblutkörperchenaufschwemmung mit 0,05 ccm frischem Meerschweinchenserum in 1,5 ccm Gesamtvolumen nach 1h bei 37°.

	1:100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600
Klare Flüssigkeit von A . . .	k	k	k	k	k	fk	m	sp	0
Unvorbehandeltes Immunserum	k	k	k	k	k	k	k	fk	st

Bezeichnung der Hämolyse.

komplett	fast komplett	sehr stark	stark	mäßig	wenig	schwach	Spur	Spürchen	keine
k	fk	sst	st	m	w	schw	sp	speh	0

Läßt man also zwischen isogenetischem Kaninchen-Schafbluthämolyisin und der Kochsalzemulsion eines alkoholischen Auszuges einer Meerschweincheniere eine Flockung eintreten, so gibt ein so vorbehandeltes Immunserum nach Entfernen der Flocken mit anderen Organauszugsemulsionen versetzt, eine erneute Flockung, wie wenn mit dem Serum noch nichts geschehen wäre. Nur derjenige Auszug, mit dem das Serum vorbehandelt war, gibt so gut wie keine Flockung mehr. Auch dieser Versuch glückt nicht immer. Es läßt sich jedoch daraus folgern, daß die Ausflockung nicht nur nicht gegen heterophiles Hammelblutantigen im allgemeinen Sinne abgestimmt ist, sondern, daß der Probe auch eine gewisse Artabgestimmtheit innewohnt, insofern Katzen- und Hundeorgane noch sehr deutliche Flockungen geben, wenn Meerschweinchennierenauszug seine flockende Wirkung erschöpft hat. Aber das Erstaunlichste ist die Tatsache, daß auch die Organe ein und derselben Tierart sich verschieden zu verhalten scheinen, was dafür spricht, daß auch das Organeiweiß als solches bei der Probe eine Rolle spielt. Man sieht sich zu der weiteren Annahme genötigt, daß das Eiweiß von Herzmuskel- und Lungenzellen der gleichen Tierart von dem Niereneiweiß verschieden ist. Dies würde jedoch nicht in Widerspruch mit manchen Beobachtungen über die Überempfindlichkeit stehen.

Prüft man nach Entfernung der ersten Flocken das Immunserum auf seine hämolytische Fähigkeit gegenüber Schafblutzellen, so zeigt der Versuch VII, daß die hämolytische Kraft zwar nachgelassen hat, aber im Vergleich zur Kontrolle nur in geringem Maße. Dieses Nachlassen der hämolytischen Kraft ist nur dem längeren Einfluß der Brutschranktemperatur zuzuschreiben, denn wiederholte Versuche wiesen keine nachweisbare Verringerung der hämolytischen Kraft gegenüber einem isogenetischen Immunserum auf, das in gleicher Weise mit NaCl + Alkohol verdünnt, die gleiche Zeit über bei 37° gestanden hat. Die Flocken selbst können aus dem Auszug stammen oder aus dem Immunserum. Stammen dieselben aus dem Auszug, dann wäre zu erwarten, daß ein Immunserum nach Erschöpfung des die Flockung gebenden Teiles eines Auszuges noch mit anderen Auszügen Ausflockung geben könnte, was nicht zu erwarten wäre, wenn die Flockung aus abgestimmten Anteilen des Immunserum stammte. Vielleicht bestehen die Flocken aus Teilen des Auszuges, die sich mit gewissen Teilen des Immunserums zusammenlagern (Adsorption) und dann unlöslich werden und ausflocken. Sind die an der Flockung beteiligten Stoffe des Immunserums mit dem Hämolyisin desselben identisch, dann dürfte nur ein sehr kleiner Teil desselben zum Zustandekommen der Flockung genügen, denn eine stärkere Abnahme der Hämolsins ist nicht nur nicht vorhanden, wie man sie bei Bindungsversuchen mit heterophilen Organzellen beobachten kann, sondern ich konnte in manchen diesbezüglichen Versuchen überhaupt keine Abnahme des Hämolsins feststellen (vgl. Versuch XIII). Dieses gilt nur gegenüber isogenetischem Kaninchen-Hammelblutantisera. Stellt man die gleichen Prüfungen mit heterogenetischen durch Vorbehandlung von Kaninchen mit Meerschweinchennierenzellen gewonnenen Serum an, so findet man folgendes:

Versuch VIIa.

0,3 ccm Immuns Serum + 1,2 NaCl-Lösung + 1,5 ccm des 1:3,5 verdünnten Auszuges. Ausflockung nach 12 Stunden bei 37°. Dann wird mit der abgeschleuderten klaren Flüssigkeit eine erneute Ausflockungsprobe angesetzt: 0,5 ccm = 0,05 Immuns Serum + 0,5 ccm Auszugsverdünnung. Ferner die hämolytische Kraft ausgewertet.

A.

	Auszug von		
	a) Hunde- lunge	b) Meerschwein- chenherz	c) Hammel- blutzellen
I. Isogenetisches Kaninchen-Hammelblutanti- serum (Höchst)	++++	++++	+
II. Heterogenetisches Kaninchen-Hammelblutanti- serum	++++	++++	++
III. Isogenetisches Meerschwein-Hammelblutanti- serum	—	—	—

B.

		Auszug von	
		Meerschweinchenherz	Hundelunge
I	a)	++	+
	b)	+	+
	c)	++++	++++
II	a)	+	—
	b)	+	—
	c)	—	—

C.

Hämolyse von 0,5 ccm Serumverdünnung + 0,5 ccm 5% Hammelblutaufschwemmung + 0,5 ccm 1:10 verd. Meerschweinchenkomplement.

		1:100	200	400	800	1600
II	sp	0	0	0	0	0
III	k	k	fk	spch	0	0

Der Versuch zeigt die gute primäre Flockung mit den beiden Kaninchen-sera, während das Meerschweinchen Serum (das gleiche wie bei Versuch X) nicht flockte, aus Gründen, die weiter unten klar gelegt werden. Hier wurde auch ein alkoholischer Auszug aus getrockneten Hammelblutzellen benutzt. Die schwache Ausflockung mit diesem Auszug beweist das Vorhandensein des von Doerr und Pick angenommenen heterophilen Antigens auch in den Hammelblutzellen. Übrigens haben schon Sachs und Guth mit solchen Auszügen Ausflockungen gesehen. — Bei der sekundären Flockung der gleichen Sera sehen wir nun, daß das heterogenetische Serum die Flockungsfähigkeit verloren hat. Das isogenetische Serum hat nach der primären Behandlung mit den stark ausflockenden Auszügen von Hundelunge und Meerschweinchen-

herz einen beträchtlichen Teil seiner ausflockenden Fähigkeit verloren und zwar mehr nach der Behandlung mit dem Meerschweinchenherzauszug. Vergleichsweise hat die Abschwächung in demselben Sinne wie Versuch VII stattgefunden. Der schwach ausflockende Hammelblutauszug hat dem isogenetischen Serum seine volle Flockungsfähigkeit für die anderen Auszüge gelassen. Die Tatsache, daß hier das heterogenetische Serum seine Flockungsfähigkeit fast ganz verlor, während das isogenetische dieselbe, wenn auch teilweise schwach behielt, wird verständlich, wenn man berücksichtigt, daß von den hier (wie auch bei Versuch X) benutzten Seren das Höchster isogenetische Immunserum einen viel höheren Titer hatte, wie das heterogenetische, so daß demzufolge auch anzunehmen war, daß auch das isogenetische Antiserum im Verhältnis mehr heterogenetische Antikörper besaß. Denn daß nur letztere für die Flockung in Frage kommen, geht schon daraus hervor, daß das nur isogenetische Antikörper enthaltende Meerschweinchen Serum überhaupt nicht auszuflocken vermochte, doch wird darauf weiter unten noch ausführlicher eingegangen werden. Prüft man das heterogenetische Kaninchenserum sowie das isogenetische Meerschweinchen Serum auf seine Hämolyse, so findet man die Hämolyse in letzterem Falle fast unverändert, während das heterogenetische Serum die hammelblutlösende Kraft vollständig verloren hat. Daß aber auch bei isogenetischen Immunseren gewisse Beziehungen zwischen Ausflockung und Hämolyse bestehen können, geht aus folgendem Versuch VIII hervor.

Versuch VIII.

Je 2 ccm 1:5 verd. Kaninchen-Schafblutantisera werden (I) mit 1 ccm 5% Hammelblutzellenaufschwemmung, und (II) mit 1 ccm einer Meerschweinchennierenzellenaufschwemmung versetzt. Nach 1 Stunde bei 37° wird abgeschleudert und die überstehende Flüssigkeit geprüft:

A. auf Hämolyse, wie bei Versuch VII.

	1 : 100	200	400	800	1600	3200
I.	k	w	0	0	0	0
II.	k	k	k	w	0	0
Kontrolle III.	k	k	k	k	k	k

B. auf Ausflockung mit gutflockendem Hundelungenauszug. 1 ccm des 1 : 10 verd. Immunserums + 0,5 1 : 6 verd. Auszuges im Gesamtvolumen 1,5 ccm. Flockung nach 12 Stunden bei 37°.

	I	+
	II	++++
Kontrolle 0,1 Immunserum	III	++++.

Dieser Versuch zeigt, daß die flockenden Substanzen ebenfalls bis zu einem gewissen Grade von Hammelblutzellen und Meerschweinchennierenzellen gebunden werden, und daß mit dieser Abnahme der flockenden Anteile eine Abnahme der Hämolyse einhergeht.

Gelegentlich dieser Versuche wurde auch die bindende Fähigkeit von Nierenzellenemulsionen geprüft, die einmal gekocht waren oder längere Zeit mit Alkohol behandelt worden waren.

Nach Untersuchungen von Doerr und Pick ist das heterophile Antigen koch- und alkoholbeständig, d. h. so vorbehandelte Zellen sind noch in der Lage

dem Kaninchenserum bei ihrer Einspritzung hammelblutlösende Eigenschaften zu erteilen. Andererseits ist es möglich mit solchen Zellaufschwemmungen die Hammelblutantikörper aus einem Kaninchenserum zu entfernen, und zwar heterogenetische vollständig, während aus isogenetischen nur diejenigen Hämolyse entfernt werden, die dem heterophilen Anteil in den roten Hammelblutzellen entsprechen. Nach Georgi raubt Alkoholbehandlung den Orgazellen diese Eigenschaft dadurch, daß das heterophile Antigen vollständig in den Alkohol übergehen soll.

Es galt zu untersuchen, ob Immunsera, die dem bindenden Einfluß von gekochtem oder mit Alkohol behandelten Orgazellen von Meerschweinchen ausgesetzt wurden, noch fähig waren das heterophile Antigen auszuflocken.

Versuch IX.

Je 0,3 ccm isogenetisches Schafblut-Kaninchennimmunserum wurde versetzt mit:

1. 3 ccm einer 5% Hammelblutkörperchenaufschwemmung,
2. 3 ccm einer gekochten Meerschweinchennierenzellenaufschwemmung,
3. 3 ccm einer Aufschwemmung von Nierenzellen, die über 6 Monate in Berührung mit 96% Alkohol waren,
4. 3 ccm einer 0,9% NaCl-Lösung.

Nach einer Stunde bei 37° wurde auf Hämolyse geprüft: 0,5 ccm der klar zentrifugierten Flüssigkeit + 0,5 ccm 5% Hammelblutaufschwemmung + 0,5 1 : 10 verd. Komplement. Ferner wurde eine Ausflockungsprobe angesetzt.

Hämolyse.						
	1 : 100	200	400	800	1600	3200
1.	k	fk	0	0	0	0
2.	k	k	k	0	0	0
3.	k	k	k	0	0	0
4.	k	k	k	k	fk	0

Ausflockung.

0,5 ccm der ausgeschleuderten Flüssigkeit + 0,5 ccm der Auszugsverdünnung (1:3,5).

	Hunde- lunge	Meerschwein- chenherz	Katzen- lunge	Hammel- blutzellen	NaCl- Lösung
1.	±	—	+	±	±
2.	—	—	±	—	±
3.	—	—	±	—	±
4.	++++	++++	++	+++	—
Auszugs-Kontrolle	—	—	—	—	—

Da bei diesem Versuch ein isogenetisches Hammelblutimmunserum geprüft wurde, dessen Hämolyse nur zu einem Teil heterogenetisch sind, so steht das Ergebnis der Hämolyse damit in vollem Einklang insofern hier das homologe Antigen fast alles Hämolyse, das heterologe Antigen dagegen nur einen Teil, eben den heterogenetischen Teil der Hämolyse entfernt hat. Zwischen den gekochten und mit Alkohol vorbehandelten Nierenzellen war kein Unterschied in ihrer Bindungsfähigkeit. Die lange Alkoholbehandlung von über 6 Monaten, die zu einem für die Ausflockung brauchbaren Auszuge geführt hatte, hatte also den Nierenzellen nicht die Fähigkeit zur Bindung der Hämolyse im isogenetischen Serum genommen. Die Abnahme der Hämolyse ist nur dem

Schwund der heterogenetischen Hämolsine zuzuschreiben und, wie im folgenden gezeigt wird, sind die Nierenzellenaufschwemmungen, auch die mit Alkohol behandelten, nur fähig den heterogenetischen Antikörper zu binden. Dies steht im Gegensatz zu der Beobachtung von Georgi, nach der den Nierenzellen durch die Alkoholbehandlung das Antigen so vollständig entzogen wird, daß ihre Bindungsfähigkeit verloren geht. Aus dem Ausfall der Ausflockungsprobe mit den verschiedenen Auszügen geht hervor, daß ein mit Nierenzellen vorbehandeltes Immunserum, das also seine isogenetischen Hämolsine noch behalten hat, doch seine ausflockende Wirkung völlig eingebüßt hat.

Es scheint also das ausflockende Vermögen der Immunsera nur an die Gegenwart von heterogenetischen Hammelbluthämolsinen geknüpft zu sein. Dies wird zur Gewißheit durch das Ergebnis folgenden Versuches.

Versuch X.

Ein Kaninchen hatte dreimal in die Ohrvene und einmal in die Bauchhöhle eine Meerschweinchennierenzellenaufschwemmung erhalten.

Ein Meerschweinchen hatte fünfmal je 1 ccm einer 10% Hammelblutkörperchenaufschwemmung in die Bauchhöhle in Abständen von 5 Tagen erhalten.

Eine Ratte war in derselben Weise wie das Meerschweinchen vorbehandelt worden.

Das Serum dieser Tiere wurde dann bei 56° inaktiviert und dann auf Hämolyse geprüft.

A.

Hämolyse

von 0,5% Hammelblut durch 0,5 ccm Serumverdünnung mit 0,5 ccm 1 : 10 verd. Meerschweinchenkomplement.

	1 : 100	200	300	400	600	800	1200	1600	2400
Kaninchen	k	k	k	k	k	k	st	m	0
Meerschwein	k	k	k	k	m	sp	0	0	0
Ratte	?	0	0	0	0	0	0	0	0

Die Komplementkontrolle war einwandfrei.

B.

Ausflockungsversuch.

Je 0,5 ccm der 1 : 3,5 verd. Auszüge wurde zu 0,1 ccm Serum in Gesamtvolumen 1 ccm gefügt. Dann 12 Stunden bei 37°.

Hammelblutantisera	Hunde- lungen- extrakt	Meerschwein- chenherz- extrakt	Hammel- blutzellen- extrakt
I. Isogenetisches Kaninchenimmunserum (Höchst)	++++	++++	±
II. Heterogenetisches Kaninchenimmunserum	++++	++++	±
III. Isogenetisches Meerschweinchenimmunserum	—	—	—
IV. Isogenetisches Rattenimmunserum	—	—	—
V. Normales Meerschweinchenimmunserum	—	—	—
VI. 0,9% NaCl-Lösung	—	—	—

C.

Bindungsversuch.

Die Sera I, II, III und IV wurden mit folgenden Zellaufschwemmungen a—g versetzt. Je 0,2 ccm Serum in 1 ccm NaCl + 1 ccm Zellaufschwemmung. Dann eine Stunde bei 37°, worauf ausgeschleudert wurde.

a) Rote Hammelblutzellen 5%	Alle Zellaufschwemmungen waren mit NaCl-Lösung ge- waschen und gaben fein zer- rieben für das Auge stark trübe Aufschwemmungen.
b) Frische Meerschweinchennierenzellen	
c) Desgl., aber kurze Zeit gekocht	
d) Meerschweinchennierenzellen, die 8 Monate unter 96% Alkohol standen	
e) Meerschweinchennierenzellen des immunisierten Tieres	
f) Rattennierenzellen des immunisierten Tieres	
g) Normale Rattennierenzellen	
h) Ohne Zellzusatz	

Prüfung der ausgeschleuderten Flüssigkeit auf Ausflockung.

0,5 ccm wurde mit 0,5 ccm des 1 : 3,5 verdünnten Auszuges versetzt. Ablesung nach 12 Stunden bei 37°.

	a	b	c	d	e	f	g	h	
I.	++++	++++	±	+	—	++++	++++	++++	Hundelungen- auszug
II.	+++	—	—	—	—	+++	++++	++++	
III.	—	—	—	—	—	—	—	—	
IV.	—	—	—	—	—	—	—	—	
I.	+++	++	±	++	—	++++	++++		Meerschwein- chenherz- auszug
II.	++	±	—	—	—	++++	++++		
III.	—	—	—	—	—	—	—		
IV.	—	—	—	—	—	—	—		

Die Auszugskontrollen waren klar.

Die bei der Bindung benutzten Hammelblutzellen waren 24 Stunden alt und neigten zur Lösung.

Dagegen waren für die Hämolyse frische Blutzellen verwandt worden.

Prüfung der ausgeschleuderten Flüssigkeit auf Hämolyse.

0,5 ccm Serumverdünnung + 0,5 ccm 1 : 10 verd. Komplement + 0,5 ccm 5% Hammelblut.
Hämolyse nach 1/2 Stunde bei 37°.

	1 : 100	200	400	800	1600		1 : 100	200	400	800	1600
a)	k	k	k	0	0	II.	a)	st	0	0	0
b)	k	k	m	0	0		b)	0	0	0	0
c)	k	k	k	0	0		c)	0	0	0	0
d)	k	k	m	0	0		d)	0	0	0	0
e)	k	k	0	0	0		e)	0	0	0	0
f)	k	k	k	m	0		f)	k	k	fk	m
g)	k	k	k	m	0		g)	k	k	sp	spch
h)	k	k	k	k	0		h)	k	k	k	m

	1 : 100	200	400	800	1600
III.	a)	k	m	0	0
	b)	k	st	spch	0
	c)	k	fk	0	0
	d)	k	sst	0	0
	e)	k	k	0	0
	f)	k	w	0	0
	g)	k	m	0	0
	h)	k	k	0	0

Die Komplementkontrolle war klar.

Das Serum IV gab von vornherein keine Hämolyse.

Was zunächst die ausflockende Wirkung der verschiedenen Sera anbetrifft, so zeigt Versuch X den deutlichen Unterschied im Verhalten der Kaninchenserä gegenüber dem Serum der Meerschweinchen. Beide Kaninchenserä, sowohl das isogenetische, wie auch das heterogenetische enthalten heterogenetische Hammelblutantikörper, bei dem ersten durch den heterophilen Teil der roten Hammelblutzellen und bei dem zweiten durch das heterophile Antigen der Meerschweinchenniere erzeugt. Aus diesem Grunde geben auch beide Sera mit den heterophilen Antigenlösungen Ausflockungen. Das mit Hammelblut behandelte Meerschweinchen dagegen besitzt nur streng isogenetische Antikörper, da die gleichfalls gebildeten heterogenetischen sofort an das heterophile Antigen der eigenen Körperzellen gebunden wurde. Trotz der guten hämolysierenden Kraft dieses Serums ist es unfähig eine Ausflockung zu geben. Dieses beweist die Abhängigkeit der Flockung von dem Vorhandensein heterogenetischer Hammelblutantikörper. Da diese in den käuflichen Immunsereen in schwankender Menge vorhanden sein dürfte, so erklärt dieser Umstand zur Genüge das häufige Ausbleiben der Flockung mit derartigen Seren trotz guter Hämolysen und auch die Unabhängigkeit der Hämolysen solcher Seren von der Ausflockung. Die Ratte hatte überhaupt kein Hammelhämolysin gebildet, trotz gleicher Vorbereitung wie das Meerschweinchen. Das Hammelhämolysin der Ratte hätte sich sonst wie das isogenetische Kaninchenserum verhalten müssen.

Der Bindungsversuch zeigt, daß alle Meerschweinchennierenzellen, auch die mit Alkohol behandelten (Gegensatz zu Georgi), die heterogenetischen Antikörper des Kaninchenserums vollständig gebunden hatten. Das isogenetische Meerschweinchenserum hat — wiederum, weil es keine heterogenetischen Antikörper enthält — auch keine Abschwächung durch die Behandlung mit den Zellaufschwemmungen erfahren. Seine hämolytische Wirkung ist die gleiche geblieben, wie die Kontrolle III h des Versuches X zeigt.

Das isogenetische Kaninchenserum hat durch die Nierenzellenaufschwemmung nur eine geringgradige Abschwächung erfahren, da diese ja nur den heterogenetischen Antikörper entfernen, der den geringeren Teil der Antikörper bildet. Es ist jedoch bemerkenswert, daß die Nierenzellen des immunisierten Meerschweinchens trotzdem dieselben im lebenden Tier zu einem Teil mit heterogenetischen Antikörpern abgesättigt wurden, trotzdem die stärkste bindende Fähigkeit zeigt, wie auch aus dem Ausfall der Ausflockungsproben mit Hundelungen- und Meerschweinchenherzauszug hervorgeht. Daß die Nierenzellen der Ratte, die ja der Kaninchengruppe zugehört, weder die Hämolsine binden, noch die Ausflockung verhindern konnten, zeigt der Versuch X in deutlicher Weise. Leider hatten die roten Blutzellen bei diesem Tage versagt, doch diesbezügliche Bindungsversuche sind ja bereits von früheren Autoren angestellt worden. Der Flockungsversuch zeigt besonders mit dem heterogenetischen Kaninchenserum II, daß die Behandlung des Serums mit den Nierenzellenaufschwemmungen jede Flockung aufgehoben hat, eben weil die heterogenetischen Antikörper entfernt worden waren.

Wir haben also gesehen, daß die Ausflockung von Hammelblutantisera mit alkoholischen Organauszügen der Meerschweinchengruppe einmal streng nur gegenüber dem heterophilen Hammelantigen abgestimmt ist, daß aber auch sowohl artabgestimmte, wie auch organabgestimmte Kräfte mitspielen.

Die Ausflockung mit dem in Alkohol gelösten heterophilen Hammelantigen findet nur bei Vorhandensein heterogenetischer Antikörper statt.

VIII. Physikalisch-Chemisches über die Ausflockung.

A. Einfluß der Verdünnung.

Seit Sachs und Rondonis Untersuchungen weiß man, daß für die Komplementbindung die Art der Verdünnung des Auszuges eine große Rolle spielt. Je langsamer die Emulsionierung des alkoholischen Auszuges mit NaCl-Lösung stattfindet, je stärker ist die Opaleszenz der Verdünnung, und je brauchbarer ist diese für die Komplementbindung, wie auch für die Ausflockungsprobe von Sachs und Georgi und von Meinicke, wobei ganz gleiche Erfahrungen gemacht wurden und auf langsame Verdünnung des alkoholischen Auszuges ganz besonderer Wert gelegt wurde. Auch bei der hier besprochenen Ausflockung ist die langsame Verdünnung ebenfalls von Wert, wie bereits Sachs und Guth und Georgi erwähnen. Ich habe jedoch bei gutflockenden Auszügen keinen Unterschied in dem Grade der Flockung bemerkt, ob die Verdünnung sehr langsam unter tropfenweisem Zusatz bei beständigem Schütteln oder durch schnellem Zusatz der Gesamtmenge der Verdünnungsflüssigkeit gemacht wurde. Im ersten Falle war die Opaleszenz eine entschieden dichtere, was besonders von dem langsamen Zusatz der allerersten Tropfen NaCl-Lösung abhängt. Aber meinen Beobachtungen nach scheint die Opaleszenz als solche kein Maßstab dafür zu sein, ob eine Auszugsverdünnung gut flockt oder nicht. So gaben z. B. die meisten meiner gutflockenden Katzenorganauszüge bei den Verdünnungen eine mit bloßem Auge kaum erkennbare Opaleszenz, manche schienen überhaupt ganz wasserklar zu bleiben, trotzdem gaben sie oft überraschend gute Flockung, während gleichzeitig angesetzte opaleszierende Meer-schweinchenauszüge manchmal nur schwach oder kaum erkennbar ausflockten.

Im allgemeinen kann man sagen, daß bei von vorneherein schwachflockenden Organauszügen, diese schwache Flockung besser bei langsamer Verdünnung des Auszuges zum Ausdruck kommt.

B. Einfluß der Konzentration.

Von Sachs und Guth ist der Verdünnungsmodus 1:6 gewählt worden, und ich habe mich der gleichen Verdünnung in den meisten Versuchen bedient. Stellt diese Verdünnung ein Optimum dar? Manchmal, aber nicht immer. Meistens nimmt der Grad der Flockung bei gleicher Menge Immunsérum mit fallender Verdünnung ab. Zu starke Konzentrationen neigen jedoch zu unabhégestimmter Flockung mit NaCl-Lösung, während zu starke Verdünnungen, wie weiter oben (Versuch IV) gezeigt werden konnte, zu Flockungen mit anderen Normalseren neigen. Ich erhielt öfters sehr gute Ausflockungen bei einwandfreien Kontrollen, wenn ich statt 1:6 das Verhältniß 1:3,5 nahm und 0,5 ccm dieser Emulsion zu Immunsérum im Gesamtvolumen von 1 ccm fügte.

Verändert man die zu gleichen Mengen Immunsérum, 0,05 ccm in 1 ccm Vol., zugesetzten Mengen der gleichen Auszugsverdünnung, dann war die Ausflockung

gleich stark in der untersuchten Breite von 2,0—0,25 manchmal bis 0,1. Auf der anderen Seite wird die Flockung bei fallender Menge Immuns serum schnell schwächer, wie die folgende Versuchsniederschrift XI zeigt.

Versuch XI.

A. Alkohol. Hundelungen- und Katzenlungenauszug wird 1 : 6 mit NaCl-Lösung verdünnt. Je 0,5 ccm der Verdünnung wird mit fallenden Mengen Immuns serum in 1,5 ccm Gesamtvolumen geprüft. Flockung nach 12 Stunden bei 37°.

Immuns serum ccm	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0
Hundelunge	+++	+++	+++	+	—	—
Katzenlunge	+++	+++	+++	±	—	—

B. Je 0,05 ccm Immuns serum in 1 ccm NaCl-Lösung wird mit fallenden Mengen der 1 : 6 verd. Auszüge geprüft.

Auszugsmenge ccm	2,0	1,5	1,0	0,5	0,25	0,1
Hundelunge	+++ trüb	+++ trüb	+++	+++	+++	+++
Katzenlunge	++	++	++	+++	+++	+

C. Einfluß der Temperatur.

Werden die Organe mit Alkohol nicht bei Zimmertemperatur, sondern bei 50° oder durch Kochen ausgezogen, so wird die ausflockende Eigenschaft mancher, nicht aller Auszüge bedeutend gehoben. Demnach ver trägt auch die ausflockende Eigenschaft des Auszuges die Temperatur des siedenden Alkohols, wie ja die hämolysinbildende und -bindende Eigenschaften der Organzellen der Meer-schweinchengruppe die Siedehitze vertragen (Doerr und Pick). Wenn es sich um Lösung von Organlipoiden handelt, ist es ja nicht anders zu erwarten, daß Kochen der Auszüge die Lösung befördert, und daß dann solche Auszüge auch bessere Flockungsergebnisse erzielen. Bei der Verdünnung gekochter Auszüge tritt durchaus nicht immer eine stärkere Opaleszenz auf, oftmals habe ich bei sehr stark flockender Wirkung überhaupt keine Opaleszenz bei der Verdünnung beobachtet. Andererseits neigten Auszüge, die durch Kochen gewonnen waren, zu unabgestimmten, wenn auch schwachen Flockungen mit anderen Seren (Hammel, Hund, Mensch).

Die Beobachtung von Sachs und Guth, daß der Flockungsvorgang am besten bei Brutschranktemperatur eintritt, kann ich bestätigen. Bei Zimmertemperatur und bei 0° kommt es auch zu allerdings einer sehr schwachen und wahrscheinlich unabgestimmten Flockung, wie sie oft auch bei den verdünnten Immuns seren ohne sonstigen Zusatz auftritt.

D. Einfluß der Salzkonzentration auf das Zustandekommen der Flockung.

Um zu untersuchen, ob bei der hier untersuchten Ausflockung die Gegenwart von Salzen nötig ist und welche Rolle die Salzkonzentration spielt, wurde der Flockungsvorgang zwischen isogenetischem Kaninchen-Hammelblutantiseraum und alkoholischen Auszügen von Organen in Aqua dest., in steigender NaCl-Konzentration und in isotonischer 8,0%iger Rohrzuckerlösung stattfinden gelassen.

Versuch XII.

Zur Reaktion gelangte 0,05 ccm Immunsrum in 0,5 ccm Volumen mit je 0,25 ccm Auszugsverdünnung. Von Auszügen wurde als gut flockender eine Mischung von gleichen Teilen gekochter Auszüge aus Meerschweinchenherz, -Niere und -Muskel genommen, und als nicht flockender diente ein alkoholischer Auszug aus Rattenorganen. Die Verdünnung geschah überall im Verhältnis 1 : 6. Während der gut flockende Auszug stets eine klare Verdünnung ohne Opaleszenz gab, waren die Verdünnungen des Rattenauszuges opaleszent.

	8% Rohrzucker		Aqua dest.	% NaCl-Lösung				
	a	b		0,45	0,9	2,0	5,0	10,0
Meerschweinchenorganauszug . .	++++	+++	+++	++++	+++	++++	+	±
Rattenorganauszug	—	—	—	—	—	—	—	—
Kontrolle für Meerschweinchenorganauszug . .	++	+	+	+	+	++	+++	±

a = auch das Immunsrum war mit 8% Rohrzucker verdünnt.

b = das Immunsrum war mit 0,9% NaCl-Lösung und nur der Auszug mit 8% Rohrzucker verdünnt.

Aus diesem Versuch geht zunächst hervor, daß die Gegenwart von NaCl zum Zustandekommen der Flockung nicht unbedingt nötig ist. Ich habe wiederholt mit verschiedenen anderen Auszügen aus Organen der Meerschweinchengruppe in Rohrzuckerlösungen sehr starke Flockungen auftreten sehen. (Vgl. Versuch XIII.) Auch bei der Verdünnung mit Aqua dest. kam es zu einer Flockung, die man nicht dem globulinfällenden Einfluß der Salzverarmung durch Wasserzusatz auf das Serum zuschreiben darf, da bei gleichen Mengenverhältnissen die Flockungen mit dem Rattenorganauszug ausblieb. Weiter scheint aus diesen und weiteren ähnlichen Versuchen hervorzugehen, daß die übliche 0,9%ige NaCl-Lösung nicht immer das Optimum der NaCl-Lösung darstellt. Manchmal gibt 0,45%ige NaCl-Lösung ein besseres Ausflockungsbild. Die starke Eigenflockung bei 2,0 und 5,0%iger NaCl-Lösung läßt die Anwendung höherer Salzkonzentrationen als 1,0% nicht ratsam erscheinen. In Anlehnung an die Versuchsanordnung der D. M.-Probe von Meinicke benutzte ich öfters 2,0%ige NaCl-Lösung. Doch bin ich wegen der häufigen Eigenflockungen davon abgekommen.

E. Über den Einfluß der Oberflächenspannung.

Schmidt-Nielsen¹⁾ hatte die Beobachtung gemacht, daß die Inaktivierung des Labfermentes durch Schütteln ausbleibt, wenn der Flüssigkeit Spuren von Saponin zugesetzt waren, die die Oberflächenspannung gegenüber Luft stark herabsetzten. Die gleiche Beobachtung hatte Shaklee²⁾ bei Pepsin und ich³⁾ mit der Schüttelinaktivierung des Komplementes gemacht. Die beim Schütteln des Meerschweinchenserums auftretende Ausfällung von Globulin blieb aus, wenn die Oberflächenspannung des Serums durch Saponinzusatz stark herabgesetzt worden war, und dadurch wurde auch die Inaktivierung des Komplementes durch noch so intensives Schütteln verhindert. Ich habe nun den Einfluß des Saponins auch auf die hier besprochene Ausflockung untersucht.

Versuch XIII.

Gut flockender alkoholischer Hundelungenauszug wurde 1 : 6 mit 0,9% NaCl-Lösung und mit 8% Rohrzuckerlösung verdünnt. Je 0,5 ccm dieser dicht opaleszierenden Emulsionen wurde zu 0,05 ccm Kaninchen-Hammelblutantisera zugesetzt. Das entweder in 1,0 ccm NaCl-Lösung oder in dem entsprechenden Volumen 8,0% Rohrzuckerlösung war. Von Saponin wurden den Rörchen 2 Tropfen einer 0,2% Lösung zugesetzt. Ablesung der Flockung nach 12 Stunden bei 37°.

NaCl-Lösung	NaCl-Lösung + Saponin	Rohrzucker	Rohrzucker + Saponin	Kontrollen		
				Extraktverdünnungen ohne Immunserum		Immunserum ohne Extrakt
				NaCl	Rohrzucker	
+++	—	++++	+	—	—	—

Nach Abschleudern der Flocken wurden die überstehenden Flüssigkeiten auf Hammelbluthämolyse geprüft. Es fand sich kein Unterschied im Vergleich zu einer die gleiche Zeit bei 37° gehaltenen und in gleicher Weise verdünnten Immunserumlösung.

Der Versuch zeigt zunächst wieder, daß zum Zustandekommen der Flockung die Gegenwart von NaCl nicht nötig ist. Ferner, daß die starke Flockung in beiden Lösungen anscheinend nichts von der hämolytischen Kraft des isogenetischen Hammelblutantisera genommen hat. Im besonderen lehrt der Versuch, daß ein geringer Zusatz von Saponin genügt, das Zustandekommen der Flockung zu verhindern. Daß jedoch die bloße Herabsetzung der Oberflächenspannung des Gemisches gegenüber Luft nicht allein genügt um die Verhinderung der Ausflockung zu erklären, geht aus folgendem Versuche mit Wittepepton hervor. Allerdings muß betont werden, daß Wittepepton, das bekanntlich die Oberflächenspannung des Lösungsmittels stark herabsetzt, in seinen Lösungen sehr leicht zu Eigenflockungen neigt. So hatte auch hier die Peptonlösung über Nacht etwas geflockt, die Flocken waren jedoch vor Ansetzen des Versuches entfernt worden.

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. 1910. 68, 317.

²⁾ Proc. Soc. Exper. Biology and Medicine. 1908/09. 6. 48.

³⁾ Journ. of Hygiene 1914. 14. 399.

Versuch XIV.

Alkoholischer Hundelungen- und Meerschweinchenherzauszug wurde 1:3,5 mit NaCl-Lösung verdünnt, und je 0,5 ccm der Auszugsverdünnung mit 0,05 ccm Kaninchen-Schafblut-antiserum im Gesamtvolumen 1 ccm versetzt.

Es wurden 2 Tropfen einer 0,2%igen Saponin- und ebenso viel einer gesättigten Peptonlösung in Wasser benutzt.

	ohne Zusatz	+ Saponin	+ Pepton	Auszugskontrollen		
				+ Saponin	+ Pepton	ohne Zusatz
Hundelungenauszug . .	++++	±	++++	—	—	—
Meerschweinchenherzaus- zug	++++	—	++++	—	—	—

Hier hat also die Oberflächenspannung erniedrigende Gegenwart von Pepton die Ausflockung nicht gehindert. Immerhin spricht der Umstand, daß Saponin die Ausflockung hemmt, dafür, daß die Flockung Folge eines physikalisch-chemischen Vorganges ist, der auf Adsorption an ultravisiblen Teilchen beruhen dürfte. Verfolgt man den Vorgang der Ausflockung mit dem Stalagmometer, so findet man folgendes:

Versuch XV.

Je 0,5 ccm heterogenetisches Kaninchen-Hammelblutantiserum (I) und isogenetisches Meerschweinchen-Hammelblutantiserum (II) wurde mit 4,5 ccm NaCl-Lösung und 5 ccm 1:3,5 verdünnten alkoholischen Auszug von Hundelunge versetzt. Die Tropfenzahl wurde mit einem Stalagmometer (Tropfenzahl für Wasser = 17) sofort nach Ansetzen der Mischung und dann nach 12 Stunden Stehen im Brutschrank bestimmt. Die Flüssigkeiten standen in fest verschlossenen kleinen Flaschen um die Alkoholverdunstung zu verhindern. Die Tropfenzahlen wurden auf ein Stalagmometer für 100 Wassertropfen umgerechnet.

Tropfenzahl sofort nach der Mischung

I 142,1

II 141,1

Flockung bei I + + + + bei II —

Tropfenzahl der abgeschleuderten Flüssigkeit

I 139,7

II 141,1.

Der Versuch zeigt demnach eine wenn auch geringe Abnahme der Tropfenzahl in der ausgeflockten Mischung, die in der nicht ausgeflockten ausblieb. Die Flockung ging demnach mit einer Zunahme der Oberflächenspannung einher.

Von R. Somogyi¹⁾ ist ebenfalls bei der Sachs-Georgischen Ausflockungsprobe eine Zunahme der Oberflächenspannung festgestellt worden. In früheren Arbeiten über den Einfluß des Schüttelns auf Serum, wobei es gleichfalls durch die Änderung der Oberflächenenergie zu einer Ausflockung kommt, konnte ich²⁾ nachweisen, daß die Trübung und Flockung des Serums ebenfalls mit einer Zunahme der Oberflächenspannung einhergeht. Man darf also bei der hier besprochenen Flockung annehmen, daß die Flocken entweder selbst aus Stoffen bestehen, die die Oberflächenspannung des Wassers gegenüber Luft

¹⁾ Münch. med. Wochenschr. 1920. Nr. 43. 1233.

²⁾ Journ. of Hyg. 1913. 13, 314. — Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankheiten 88, 495.

herabsetzen (Fettsäuren, Lipide), oder aber, daß solche Stoffe, an die Flocken adsorbiert werden.

Die Tatsache, daß das heterophile Hammelblutantigen aus Organen durch Alkohol ausziehbar ist, nach Georgi sogar vollständig, spricht sehr dafür, daß das Antigen lipoider Natur ist. Es wird sich daher auch aus den Organen in reiner Form darstellen lassen. Untersuchungen darüber sind im Gange. Wenn die Voraussetzung richtig ist, daß es sich bei der hier besprochenen Ausflockung um den sichtbaren Ausdruck einer abgestimmten Antigenantikörperwirkung handelt, dann kann man zwanglos annehmen, daß in den Flocken eine Verbindung beider vorliegt.

Schüttelt man die mit Kochsalzlösung gereinigten und in etwas Kochsalzlösung feinstens aufgeschwemmten Flocken mit Äther, hebt dann nach scharfer Ausschleuderung den klaren Äther ab und läßt ihn verdunsten, so ergibt sich ein geringer Rückstand. Dieser gibt mit Alkohol geschüttelt eine opaleszierende Lösung, die beim Ausschleudern eine Spur ungelösten Rückstandes zeigt. Wird nun die alkoholische Lösung im Verhältnis 1:3,5 mit NaCl-Lösung verdünnt und davon 0,5 ccm zu 0,1 ccm heterogenetischem Kaninchenserum im Gesamtvolumen von 1 ccm zugesetzt, so erhält man nach 12stündigem Stehen im Brutschrank eine erneute starke Flockung bei klaren Kontrollen.

Man kann demnach aus den Flocken das die Ausflockung bewirkende Antigen wiedergewinnen, und zwar durch Verfahren, die unbedingt für eine lipoider Natur desselben sprechen.

IX. Über Immunisierungsversuche mit den alkoholischen Auszügen der heterophilen Organe.

Man sollte nun erwarten, daß es auch gelingt mit den Rückständen dieser alkoholischen Organauszüge bei Kaninchen heterogenetische Hammelblutantikörper zu erzeugen. Dies um so mehr, als die Erzeugung solcher Antikörper durch die Organzellen selbst sehr leicht ist und verhältnismäßig wenige Zellen genügen.

Versuche von Anako¹⁾ mit alkoholischen Organextrakten von entbluteten Meerschweinchenorganen bei Kaninchen Hämolysinbildung hervorzurufen, scheiterten. Anako kam zum Schluß, „daß die antikörpererregende Substanz der Organe nicht durch Alkohol extrahierbar ist“. Diese Folgerung erwies sich durch die weitere Forschung als verfrüht. Von Thiele und Embleton²⁾ sind aus anderen Gesichtspunkten Versuche gemacht worden, die in diesen Zusammenhang gehören. Mit den Rückständen von Azeton-, Äther- und Alkoholauszügen aus roten Schafblutzellen gelang ihnen nicht bei Kaninchen-Schafblutantisera zu erzeugen. Auch mit den Rückständen von Katzenorganauszügen konnten sie keine Antikörper bei Kaninchen erzeugen, jedoch prüften diese Autoren in letzterem Falle die Hämolyse gegen Katzenblutzellen und nicht gegen Hammelblutzellen.

Andererseits war es Bang und Forßman³⁾ gelungen mit den Lipiden aus Schafblutzellen bei Kaninchen-Hammelbluthämolysine zu erzeugen. Der-

¹⁾ Zeitschr. f. Chemotherapie. O. 1913 1, 298.

²⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforschung 1913. 16, 160.

³⁾ Beiträge z. Chem., Phys. u. Pathol. 1906. 8, 238.

artige Hämolysine müßten, da den Schafblutzellen durch lipoidlösende Mittel wie Alkohol nur das heterophile Antigen entzogen wird, der heterogenetischen Art entsprechen und wären als solche mit den Normalhämolysinen identisch und von den isogenetischen Antikörpern zu unterscheiden. Diesbezügliche Versuche waren damals noch nicht angestellt worden, gewinnen aber durch unsere neueren Kenntnisse erhöhtes Interesse.

Ich selbst habe eine Reihe von Kaninchen mit den Rückständen von Äther- und Alkoholauszügen aus getrockneten Organen von Meerschweinchen, Hunden und Katzen zu immunisieren versucht. Jedoch fielen die bereits zweimal in die Vene vorbehandelten Tiere einer Stallseuche zum Opfer. Das dem Herzen der toten Tiere entnommene Blut wies jedoch keine Fähigkeit gegenüber Schafblutzellen auf, was in Anbetracht, daß eine einmalige Einspritzung einiger Nierenzellen in die Vene bereits genügt um einen den Titer der Normalhämolysine beträchtlich übersteigende hämolysierende Eigenschaft zu erzeugen, vorderhand dahin zu deuten ist, daß das Antigen in den Lipoidauszügen weniger immunkörpererzeugend wirkt wie das betreffende Antigen im natürlichen Zusammenhang mit den Körperzellen. Aus dem ganzen Zusammenhang der Versuche in dieser Arbeit dürfte hervorgehen, daß das heterophile Hammelblutantigen ein Lipoid und wahrscheinlich dasselbe Lipoid ist, welches Bang und Forßman aus roten Hammelblutzellen in Händen hatten. Diese Autoren führten als erste den Nachweis, daß ein Lipoid als Antigen wirken kann. Es ist klar, daß damit auch das Vorhandensein von Lipoidantikörpern erwiesen war, wenn auch die Reindarstellung letzterer von den Autoren nicht versucht wurde. Ist das Vorhandensein von Lipoidantikörpern erwiesen, dann ist die Reindarstellung derselben, so interessant sie auch sein mag, von untergeordneter Bedeutung. Die Beobachtungen von Bang und Forßman wurden von Landsteiner und Dautwitz ¹⁾ sowie von Takaki ²⁾ bestätigt, von anderen Autoren jedoch bezweifelt. Klarer liegen die Verhältnisse bei den aus säurefesten Stäbchen dargestellten Lipoiden und Neutralfetten. Diesen gegenüber ist das Vorhandensein abgestimmter Gegenstoffe sowohl durch das Komplementbindungsverfahren, als auch durch die Quaddelprobe in so zahlreichen Versuchen und so einwandfrei durch Much und seine Mitarbeiter ³⁾ nachgewiesen worden, daß an dem Vorhandensein von Lipoidantikörpern und der Antigenrolle von Lipoiden kein Zweifel gerechtfertigt ist.

In Anbetracht der Wichtigkeit der Untersuchungen über das heterophile Hammelblutantigen für die Lipoidantikörper werden die Immunisierungsversuche bei Tieren in größerem Maßstabe wiederholt und später darüber berichtet werden.

Zusammenfassung.

Es wurde zunächst bestätigt, daß ein Hammelblut-Kaninchenserum mit alkoholischen Auszügen aus Organen von Meerschweinchen eine Ausflockung gibt.

¹⁾ Beiträge z. chem. Physiol. u. Path. 1907 9, 431..

²⁾ Ebenda 1908. 11, 274.

³⁾ Brauers Beiträge z. Klinik d. Tuberkulose 1911. 20, H. 3.

Diese Ausflockung kommt mit fast allen alkoholischen Organauszügen von Meerschweinchen zustande. Am schlechtesten fällt die Flockung mit Leberauszug aus. Dies konnte wenigstens teilweise auf das Vorhandensein von Gallebestandteilen zurückgeführt werden. Gar nicht flocken alkoholische Auszüge aus dem Blute. Ferner erwiesen sich solche aus dem Körperfett als untauglich für die Flockung.

Die alkoholischen Auszüge aus gewissen Organen von Katzen und Hunden gaben gleichfalls Ausflockungen mit Kaninchen-Hammelblutantisera, besonders solche von Lungen. Dagegen kam mit Organauszügen von Mensch, Ratte und Kaninchen keine Flockung zustande. Die Tiere konnten also nach dem Ausfall der Ausflockung in die gleichen Gruppen eingereiht werden, wie nach der Fähigkeit bei Kaninchen Hämolysinbildung gegen Hammelblut hervorzu- rufen (Meerschweinchen- und Kaninchengruppe). Die weiße Maus nimmt nach dem Ausfall der Flockung eine schwankende Mittelstellung ein.

Bei Einhaltung gewisser Versuchsbedingungen geben die normalen Sera von Menschen und den verschiedenen Tieren keine Ausflockungen mit den Organauszügen der Tiere der Meerschweinchengruppe. Dies kann jedoch bei Änderung der Versuchsbedingungen eintreten, besonders bei schwächeren Auszugsverdün- nungen und größeren Serummengen. Wahrscheinlich kommen hierbei die Ham- melblutnormalhämolysine zur Wirkung.

Hammelblut-Kaninchenantisera geben nur dann Flockungen, wenn sie heterogenetische Hämolysine enthalten. Hammelblut-Meerschweinchen-Anti- sera, die frei von heterogenetischen Hämolysinen sind, geben niemals Flockungen mit den alkoholischen Auszügen des heterophilen Antigens aus Organen.

Die Flockung ist streng abgestimmt und als die physikalisch-chemische Begleiterscheinung einer Antigenantikörperwirkung aufzufassen, die sich zwischen dem heterophilen Antigen und den heterogenetischen Hammelblutantikörpern abspielt. Daneben treten aber noch Kräfte auf, die das Vorhandensein einer Art- und sogar einer Organabgestimmtheit wahrscheinlich machen.

Es besteht nur eine mittelbare Abhängigkeit zwischen der flockenden Eigen- schaft eines Immunsersums und seiner hämolysierenden, insofern letztere, wenn an isogenetische Antikörper gebunden, nichts mit der Ausflockung zu tun hat. Dagegen geht die Ausflockung mit einem Schwund der heterogenetischen Hämolysine einher und umgekehrt.

Das heterophile Hammelblutantigen läßt sich in Hinblick auf die Flockung am besten mit Alkohol aus frischen Organen ausziehen. Andere Ausziehungsmittel wie Chloroform, Azeton, Ligroin, Äther, Toluol liefern wohl Auszüge, die wahrscheinlich ebenfalls, wie bei Chloroform und Azeton, das heterophile Antigen enthalten, die aber durch andere Fett- und Lipoidbeimengungen zur Anstellung der Ausflockungsprobe unbrauchbar sind. Das gleiche gilt in geringerem Grade für die Alkoholauszüge aus getrockneten Organen.

Eine abgestimmte Ausflockung zwischen Kochsalzauszügen aus Meer- schweinchenorganen mit Kaninchen-Hammelblutantisera konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Alkohollösliche Lipoidstoffe sind zum Zustande- kommen der abgestimmten Flockung nötig.

Eine tropfenweise Verdünnung der alkoholischen Auszüge ist zu empfehlen, wenn sie auch für stark antigenhaltige Auszüge nicht unbedingt nötig ist. Opales-

zenz der Verdünnung ist kein unbedingtes Erfordernis für ein gutes Flockungsergebnis.

Für die Konzentration der Auszugsverdünnung gibt es eine optimale Zone, jedoch ist die wirklich vorhandene Menge des Antigens gegenüber einem Immunsérum von geringerer Bedeutung für den Ausfall der Flockung.

Die Flockung nimmt bei steigender Kochsalzkonzentration ab. Kann aber auch in Aqua dest. sowie in isotonischer Rohrzuckerlösung stattfinden. Die Gegenwart von Kochsalz ist nicht unbedingt nötig.

Durch Zusatz geringer Mengen von Saponin wird das Zustandekommen der Flockung verhindert. Die Flockung selbst geht mit einer Zunahme der Oberflächenspannung einher. Durch Ausziehen mit Äther-Alkohol kann das Antigen aus den Flocken wiedergewonnen werden.

Versuche durch Einspritzung von Auszugsrückständen, bei Kaninchenhämolyseinbildung hervorzurufen mißglückten, doch werden dieselben wieder aufgenommen und darüber später berichtet.